

VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS

PCT

INTERNATIONALER VORLÄUFIGER BERICHT ÜBER DIE PATENTIERBARKEIT

(Kapitel II des Vertrags über die internationale Zusammenarbeit auf dem Gebiet des Patentwesens)

REC'D 02 AUG 2005

dem Gebiet des Patentwesens)

WIPO

PCT

Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts M/44162-PCT	WEITERES VORGEHEN		siehe Formblatt PCT/PEA/416
Internationales Aktenzeichen PCT/EP2004/006564	Internationales Anmeldedatum (Tag/Monat/Jahr) 17.06.2004	Prioritätsdatum (Tag/Monat/Jahr) 18.06.2003	
Internationale Patentklassifikation (IPK) oder nationale Klassifikation und IPK C12P7/42, C12P41/00, C12N1/20, C12N15/01, C12N9/90, C12N15/52, C12N15/11, C12N15/74			
Anmelder BASF AKTIENGESELLSCHAFT et al.			
<p>1. Bei diesem Bericht handelt es sich um den internationalen vorläufigen Prüfungsbericht, der von der mit der Internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde nach Artikel 35 erstellt wurde und dem Anmelder gemäß Artikel 36 übermittelt wird.</p> <p>2. Dieser BERICHT umfaßt insgesamt 7 Blätter einschließlich dieses Deckblatts.</p> <p>3. Außerdem liegen dem Bericht ANLAGEN bei; diese umfassen</p> <p>a. <input checked="" type="checkbox"/> (<i>an den Anmelder und das Internationale Büro gesandt</i>) insgesamt 4 Blätter; dabei handelt es sich um <input checked="" type="checkbox"/> Blätter mit der Beschreibung, Ansprüchen und/oder Zeichnungen, die geändert wurden und diesem Bericht zugrunde liegen, und/oder Blätter mit Berichtigungen, denen die Behörde zugestimmt hat (siehe Regel 70.16 und Abschnitt 607 der Verwaltungsvorschriften). <input type="checkbox"/> Blätter, die frühere Blätter ersetzen, die aber aus den in Feld Nr. 1, Punkt 4 und im Zusatzfeld angegebenen Gründen nach Auffassung der Behörde eine Änderung enthalten, die über den Offenbarungsgehalt der internationalen Anmeldung in der ursprünglich eingereichten Fassung hinausgeht.</p> <p>b. <input type="checkbox"/> (<i>nur an das Internationale Büro gesandt</i>) insgesamt (bitte Art und Anzahl der/des elektronischen Datenträger(s) angeben), der/die ein Sequenzprotokoll und/oder die dazugehörigen Tabellen enthält/enthalten, nur in computerlesbarer Form, wie im Zusatzfeld betreffend das Sequenzprotokoll angegeben (siehe Abschnitt 802 der Verwaltungsvorschriften).</p>			
<p>4. Dieser Bericht enthält Angaben zu folgenden Punkten:</p> <p> <input checked="" type="checkbox"/> Feld Nr. I Grundlage des Bescheids <input type="checkbox"/> Feld Nr. II Priorität <input type="checkbox"/> Feld Nr. III Keine Erstellung eines Gutachtens über Neuheit, erforderliche Tätigkeit und gewerbliche Anwendbarkeit <input type="checkbox"/> Feld Nr. IV Mangelnde Einheitlichkeit der Erfindung <input checked="" type="checkbox"/> Feld Nr. V Begründete Feststellung nach Artikel 35(2) hinsichtlich der Neuheit, der erforderlichen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung <input type="checkbox"/> Feld Nr. VI Bestimmte angeführte Unterlagen <input type="checkbox"/> Feld Nr. VII Bestimmte Mängel der internationalen Anmeldung <input type="checkbox"/> Feld Nr. VIII Bestimmte Bemerkungen zur internationalen Anmeldung </p>			
Datum der Einreichung des Antrags 11.04.2005	Datum der Fertigstellung dieses Berichts 01.08.2005		
Name und Postanschrift der mit der Internationalen Prüfung beauftragten Behörde  Europäisches Patentamt D-80298 München Tel. +49 89 2399 - 0 Tx: 523656 epmu d Fax: +49 89 2399 - 4465	Bevollmächtigter Bediensteter Döpfer, K-P Tel. +49 89 2399-8547		
 Europäisches Patentamt • European Patent Office • Oficina Europea de Patentes			

INTERNATIONALER VORLÄUFIGER BERICHT ÜBER DIE PATENTIERBARKEIT

Internationales Aktenzeichen
PCT/EP2004/006564

Feld Nr. I Grundlage des Berichts

1. Hinsichtlich der **Sprache** beruht der Bericht auf der internationalen Anmeldung in der Sprache, in der sie eingereicht wurde, sofern unter diesem Punkt nichts anderes angegeben ist.

Der Bericht beruht auf einer Übersetzung aus der Originalsprache in die folgende Sprache, bei der es sich um die Sprache der Übersetzung handelt, die für folgenden Zweck eingereicht worden ist:

internationale Recherche (nach Regeln 12.3 und 23.1 b))
 Veröffentlichung der internationalen Anmeldung (nach Regel 12.4)
 internationale vorläufige Prüfung (nach Regeln 55.2 und/oder 55.3)

2. Hinsichtlich der **Bestandteile*** der internationalen Anmeldung beruht der Bericht auf (*Ersatzblätter, die dem Anmeldeamt auf eine Aufforderung nach Artikel 14 hin vorgelegt wurden, gelten im Rahmen dieses Berichts als "ursprünglich eingereicht" und sind ihm nicht beigefügt*):

Beschreibung, Seiten-

1-40 . . . in der ursprünglich eingereichten Fassung

Ansprüche, Nr.

1-21 eingereicht mit dem Antrag

- einem Sequenzprotokoll und/oder etwaigen dazugehörigen Tabellen - siehe Zusatzfeld betreffend das Sequenzprotokoll

3. Aufgrund der Änderungen sind folgende Unterlagen fortgefallen:

 - Beschreibung: Seite
 - Ansprüche: Nr.
 - Zeichnungen: Blatt/Abb.
 - Sequenzprotokoll (*genaue Angaben*):
 - etwaige zum Sequenzprotokoll gehörende Tabellen (*genaue Angaben*):

4. Dieser Bericht ist ohne Berücksichtigung (von einigen) der diesem Bericht beigefügten und nachstehend aufgelisteten Änderungen erstellt worden, da diese aus den im Zusatzfeld angegebenen Gründen nach Auffassung der Behörde über den Offenbarungsgehalt in der ursprünglich eingereichten Fassung hinausgehen (Regel 70.2 c)).

 - Beschreibung: Seite
 - Ansprüche: Nr.
 - Zeichnungen: Blatt/Abb.
 - Sequenzprotokoll (*genaue Angaben*):
 - etwaige zum Sequenzprotokoll gehörende Tabellen (*genaue Angaben*):

* Wenn Punkt 4 zutrifft, können einige oder alle dieser Blätter mit der Bemerkung "ersetzt" versehen werden.

**INTERNATIONALER VORLÄUFIGER BERICHT
ÜBER DIE PATENTIERBARKEIT**

Internationales Aktenzeichen
PCT/EP2004/006564

Feld Nr. V Begründete Feststellung nach Artikel 35 (2) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderischen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung

1. Feststellung
- | | |
|--------------------------------|-------------------------------|
| Neuheit (N) | Ja: Ansprüche 1-10,12,18-21 |
| | Nein: Ansprüche 11,13-17 |
| Erfinderische Tätigkeit (IS) | Ja: Ansprüche 1-10, 12, 18-21 |
| | Nein: Ansprüche 11,13-17 |
| Gewerbliche Anwendbarkeit (IA) | Ja: Ansprüche: 1-21 |
| | Nein: Ansprüche: |

2. Unterlagen und Erklärungen (Regel 70.7):

siehe Beiblatt

**INTERNATIONALER VORLÄUFIGER
BERICHT ZUR PATENTIERBARKEIT
(BEIBLATT)**

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP2004/006564

Zu Punkt I

Grundlage des Bescheides

1. Die mit dem Antrag auf vorläufige internationale Prüfung eingegangenen Ansprüche 1-21 entsprechen den Forderungen des Artikels 34(2) PCT und sind daher als Grundlage für die internationale vorläufige Prüfung herangezogen worden.

Zu Punkt V

Begründete Feststellung hinsichtlich der Neuheit, der erfinderischen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung

1. Es wird auf die folgenden Dokumente verwiesen:

- D1: SILVIA M. GLÜCK ET AL.: "Lactate Racemase as a Versatile Tool for the Racemization of Alpha-Hydroxycarboxylic Acids" CHEMICKÉ LISTY, Bd. 97, Nr. 6, 1. Juni 2003 (2003-06-01), Seite 363, XP002301107 PRAHA, CZ - wurde laut Erklärung von Prof. Vilim Simanek (Mitherausgeber der Chemicke Listy) nach dem Prioritätsdatum der Öffentlichkeit zugänglich gemacht - D1 wird demnach als nicht dem Stand der Technik gem. Regel 64(2) PCT zugehörig angesehen.
- D2: SCHNELL, BARBARA ET AL: "Enzymatic racemization and its application to synthetic biotransformations" ADVANCED SYNTHESIS & CATALYSIS , 345(6+7), 653-666 CODEN: ASCAF7; ISSN: 1615-4150, 13. Juni 2003 (2003-06-13), XP002301108
- D3: LIU S -Q: "Practical implications of lactate and pyruvate metabolism by lactic acid bacteria in food and beverage fermentations." INTERNATIONAL JOURNAL OF FOOD MICROBIOLOGY, Bd. 83, Nr. 2, 15. Juni 2003 (2003-06-15), Seiten 115-131, XP002301109 ISSN: 0168-1605
- D4: STRAUSS U T ET AL: "Deracemization of (++)-mandelic acid using a lipase-mandelate racemase two-enzyme system" TETRAHEDRON ASYMMETRY 1999 UNITED KINGDOM, Bd. 10, Nr. 21, 1999, Seiten 4079-4081, XP002301110 ISSN: 0957-4166
- D5: FELFER ULFRIED ET AL: "Substrate spectrum of mandelate racemase. Part 2. (Hetero)-aryl-substituted mandelate derivatives and modulation of activity"

**INTERNATIONALER VORLÄUFIGER
BERICHT ZUR PATENTIERBARKEIT
(BEIBLATT)**

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP2004/006564

JOURNAL OF MOLECULAR CATALYSIS B ENZYMATIC, Bd. 15, Nr. 4-6, 1.
November 2001 (2001-11-01), Seiten 213-222, XP002301111 ISSN: 1381-1177

- D6: SCHAFER SUSAN L ET AL: "Mechanism of the reaction catalyzed by mandelate racemase: Structure and mechanistic properties of the D270N mutant" BIOCHEMISTRY, Bd. 35, Nr. 18, 1996, Seiten 5662-5669, XP002301112 ISSN: 0006-2960
- D7: GARCIA-VILOCA M ET AL: "A QM/MM study of the racemization of vinylglycolate catalyzed by mandelate racemase enzyme." JOURNAL OF THE AMERICAN CHEMICAL SOCIETY. 31 JAN 2001, Bd. 123, Nr. 4, 31. Januar 2001 (2001-01-31), Seiten 709-721, XP002301113 ISSN: 0002-7863
- D8: RONGSHI LI ET AL.: "Racemization of Vinylglycolate by Mandelates Racemase" JOURNAL OF ORGANIC CHEMISTRY, Bd. 60, Nr. 11, 1995, XP002301114
- D9: EP-A-0 596 466 (TANABE SEIYAKU CO) 11. Mai 1994 (1994-05-11)

2. Neuheit und Erfinderische Tätigkeit (Artikel 33(2)(3) PCT)

- 2.1 Gegenstand der vorliegenden Anmeldung ist ein Verfahren zur Isomerisierung von alpha-Hydroxycarbonsäuren unter Verwendung mikrobieller Lactatracemases mit erweitertem Wirkungsspektrum, besagte Lactatracemases per se und für sie kodierende Nukleinsäuren, Screeningverfahren auf besagte Racemases, Expressionvektoren, die Racemase exprimierende rekombinante Mikroorganismen, Verfahren zur Herstellung bzw. Isolierung eines Proteins mit alpha-Hydroxycarbonsäure-Racemase-Aktivität.
- 2.2. Der Stand der Technik wie in den Dokumenten D2 bis D9 offenbart, beschreibt Racemisierungsverfahren von alpha-Hydroxycarbonsäuren mittels Enzymen oder Mikroorganismen, die eine hohe Substratspezifität besitzen. Lactatracemases mit erweitertem Substratspektrum, d.h. Enzyme, die Lactat und alpha-Hydroxycarbonsäuren der allgemeinen Formel (I) racemisieren, und demzufolge auch ihre Verwendungen sind neu. Die vorliegenden Ansprüche 1-10, 12, 18-21 genügen daher den Kriterien der Neuheit gem. Artikel 33(2) PCT.

Die Enzyme an sich wie auch die Screeningverfahren der Ansprüche 8, 11, 13-17 sind nicht ausschließlich auf Lactatracemases mit erweitertem Substratspektrum (d.h. mit Verbindungen der allgemeinen Formel (I)) gerichtet. Das Screeningverfahren des Anspruchs 8 erfordert Mikroorganismen, die alpha-Hydroxycarbonsäure-Racemase-Aktivität exprimieren und Lactat bilden oder metabolisieren, wobei die letztere Aktivität nicht notwendigerweise an die Racemaseaktivität gebunden sein muß, d.h. es wird auch auf Enzyme gescreent, die ein enges Substratspektrum besitzen. Bereits bekannte Enzyme und Verfahren zu ihrer Isolierung werden damit erfaßt, wobei die Ansprüche 11-13 und 17 für diese Gegenstände nicht neu sind (siehe D6, Materials and Methods). Bezuglich der Lactatracemases mit erweitertem Substratspektrum wie in Anspruch 1 erwähnt ist Neuheit festzustellen.

- 2.3 Die Dokumente D2 bis D6 können als nächstliegender Stand der Technik angesehen werden. Diese Dokumente offenbaren Racemisierungsverfahren mittels Lactat- bzw. Mandelatracemase mit den bekannten Einschränkungen hinsichtlich der Substrate. Demzufolge kann die der vorliegenden Anmeldung zugrundeliegende technische Aufgabe darin gesehen werden, einen Biokatalysator zu finden, der geeignet ist, alpha-Hydroxycarbonsäuren zu isomerisieren, die nicht dem Substratspektrum der Mandelatracemase zugehörig sind und gegenüber der Lactatracemase ein erweitertes Substratspektrum besitzen und die in entsprechenden Isomerisierungsverfahren Anwendung finden. Die Lösung ist das Verfahren des Anspruchs 1, indem eine Lactatracemase (z.B. aus den Mutanten aus den *Lactobacillus spp.* des Anspruchs 6) mit erweitertem Substratspektrum eingesetzt wird. Der Stand der Technik gibt keine Hinweise auf Lactatracemase-Enzyme mit Verbindungen der allgemeinen Formel (I) einschließenden breiterer Substratspezifität, d.h. diese Gegenständen können im Lichte des Standes der Technik erfinderische Tätigkeit zuerkannt werden. Da die Screeningverfahren und die Enzyme an sich die gleichen Beschränkungen enthalten, ist für alle Ansprüche 1-10, 12, 18-21 erfinderische Tätigkeit zuzerkennen.

2.4 Gewerbliche Anwendbarkeit (Artikel 33(4) PCT)

Alle vorliegenden Ansprüche genügen den Kriterien des Artikels 33(4) PCT

**INTERNATIONALER VORLÄUFIGER
BERICHT ZUR PATENTIERBARKEIT
(BEIBLATT)**

Internationales Aktenzeichen

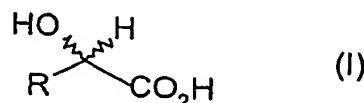
PCT/EP2004/006564

hinsichtlich ihrer gewerblichen Anwendbarkeit.

Patentansprüche

1. Verfahren zur mikrobiologischen Isomerisierung von alpha-Hydroxycarbonsäuren der Formel I

5



worin

10 R für geradkettiges oder verzweigtes C₂-C₈-Alkyl oder C₂-C₈-Alkenyl oder –(CH₂)_n-Cyc steht, worin n für einen ganzzahligen Wert von 0 bis 4 steht und Cyc für einen gegebenenfalls ein- oder mehrfach substituierten, ein- oder zweikernigen carbo- oder heterocyclischen Ring steht,

15 wobei man ein Substrat, enthaltend im wesentlichen eine erste stereoisomere Form einer alpha-Hydroxycarbonsäure der Formel (I), mit Hilfe eines Enzyms mit alpha-Hydroxycarbonsäure-Racemase-Aktivität isomerisiert und gegebenenfalls das dabei gebildete Isomerengemisch oder ein gebildetes zweites Stereoisomer isoliert, oder ein gebildetes zweites Stereoisomer aus dem Reaktionsgleichgewicht entfernt,

20

wobei das Enzym eine Lactatracemase mit erweitertem Substratspektrum ist, welche wenigstens eine weiter alpha-Hydroxycarbonsäure der Formel I isomerisiert.

25 2. Verfahren nach Anspruch 1, wobei die enzymatische Isomerisierung durch Umsetzung des Substrats mit gereinigtem Enzym, einem enzymhaltigen Zellextrakt oder in Gegenwart ganzer Zellen, welche wenigstens ein Enzym mit alpha-Hydroxycarbonsäure-Racemase-Aktivität exprimieren, erfolgt.

30 3. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei das Enzym mit alpha-Hydroxycarbonsäure-Racemase-Aktivität aus Mikroorganismen der Gattung *Lactobacillus* oder *Lactococcus* isolierbar ist.

M/44162

4. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3, wobei die Umsetzung in Gegenwart ganzer Zellen von Mikroorganismen der Gattung *Lactobacillus* oder *Lactococcus*, oder ganzer Zellen eines rekombinanten Mikroorganismus, welche alpha-Hydroxycarbonsäure-Racemase-Aktivität exprimieren, erfolgt.
5.
5. Verfahren nach Anspruch 4 wobei der Mikroorganismus ausgewählt ist unter *L. paracasei*, *L. delbrueckii*, *L. sakei* und *L. oris*.
6. Verfahren nach Anspruch 5, wobei der Mikroorganismus ausgewählt ist unter den Stämmen *L. paracasei* DSM 20207 (DSM 15755) und DSM 2649 (DSM 15751), *L. delbrueckii* DSM20074 (DSM 15754), *L. sakei* DSM 20017 (DSM 15753) und *L. oris* DSM 4864 (DSM 15752).
10
7. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche wobei das Enzym wenigstens eine Verbindung ausgewählt unter Phenyllactat, 4-Fluorphenyllactat, 2-Hydroxy-4-phenylbuttersäure, 2-Hydroxy-4-methylpentancarbonsäure, 2-Hydroxy-3-methylbuttersäure isomerisiert.
15
8. Screeningverfahren für Mikroorganismen welche ein Enzym mit alpha-Hydroxycarbonsäure-Racemase-Aktivität exprimieren, wobei man einen Lactat bildenden oder Lactat metabolisierenden Mikroorganismus, in welchem man die Racemase-Aktivität vermutet, in Gegenwart eines Substrats, enthaltend im wesentlichen eine stereoisomere Form einer alpha-Hydroxycarbonsäure der obigen Formel I, kultiviert und das Reaktionsmedium auf Racemisierung des Substrats untersucht.
20
9. Screeningverfahren nach Anspruch 8, wobei man Mikroorganismen gemäß der Definition in einem der Ansprüche 4 und 5 screent.
25
- 30 10. Screeningverfahren nach einem der Ansprüche 8 und 9, wobei man auf solche Mikroorganismen screent, welche das im wesentlichen stereoisomere Substrat zu 1 bis 100% racemisieren.
- 35 11. alpha-Hydroxycarbonsäure-Racemase, erhältlich durch Kultivierung eines in einem Screeningverfahren nach einem der Ansprüche 8 bis 10 positiv auf Race-M/44162

- mase-Aktivität getesteten Mikroorganismus und Isolierung der alpha-Hydroxycarbonsäure-Racemase aus der Kultur.
12. alpha-Hydroxycarbonsäure-Racemase nach Anspruch 11, welche wenigstens 5 eine alpha-Hydroxycarbonsäure der obigen Formel I zu 1 bis 100%, vorzugsweise 20 bis 100 %, insbesondere 50 bis 100 % racemisiert.
13. Nukleinsäuresequenz, kodierend für wenigstens eine alpha-Hydroxycarbonsäure-Racemase nach Anspruch 11 oder 12. 10
14. Expressionsvektor, enthaltend eine kodierende Nukleinsäuresequenz nach Anspruch 13 operativ verknüpft mit wenigstens einer regulativen Nukleinsäuresequenz.
15. Rekombinanter prokaryotischer oder eukaryotischer Mikroorganismus, enthaltend wenigstens eine Nukleinsäuresequenz gemäß Anspruch 13 oder wenigstens einen Expressionsvektor gemäß Anspruch 14. 15
16. Verfahren zur Herstellung eines Proteins mit alpha-Hydroxycarbonsäure-Racemase-Aktivität, wobei man einen rekombinanten Mikroorganismus nach Anspruch 15 kultiviert und das Protein aus der Kultur isoliert. 20
17. Verfahren zur Isolierung eines Proteins mit alpha-Hydroxycarbonsäure-Racemase-Aktivität, wobei man einen positiv auf Racemase-Aktivität getesteten Mikroorganismus aufschließt, Zellwandfragmente abtrennt und das Protein mit der gewünschten Enzymaktivität isoliert. 25
18. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 7, wobei man aus dem gebildeten Isomerengemisch das gewünschte Stereoisomer im Wesentlichen entfernt und den Rückstand erneut einer Isomerisierung unterzieht. 30
19. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 7, wobei man das gebildete Isomerengemisch einer chemischen oder enzymatischen stereoselektiven Folgereaktion unterzieht und das anfallende Reaktionsgemisch erneut einer Isomerisierung unterzieht. 35

M/44162

20. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 7, wobei die Isomerisierungsreaktion mit einer chemischen oder enzymatischen, enantioselektiven Folgereaktion kopelt, wobei das gewünschte gebildete Stereoisomer der alpha-Hydroxycarbonsäure aus dem Reaktionsgleichgewicht entfernt wird.
- 5
21. Verfahren nach einem der Ansprüche 19 und 20, wobei die chemische oder enzymatische, enantioselektive Folgereaktion ausgewählt ist unter einer Veresterung und einer Amidierung der alpha-Hydroxycarbonsäure.

10

15

M/44162